

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



DM

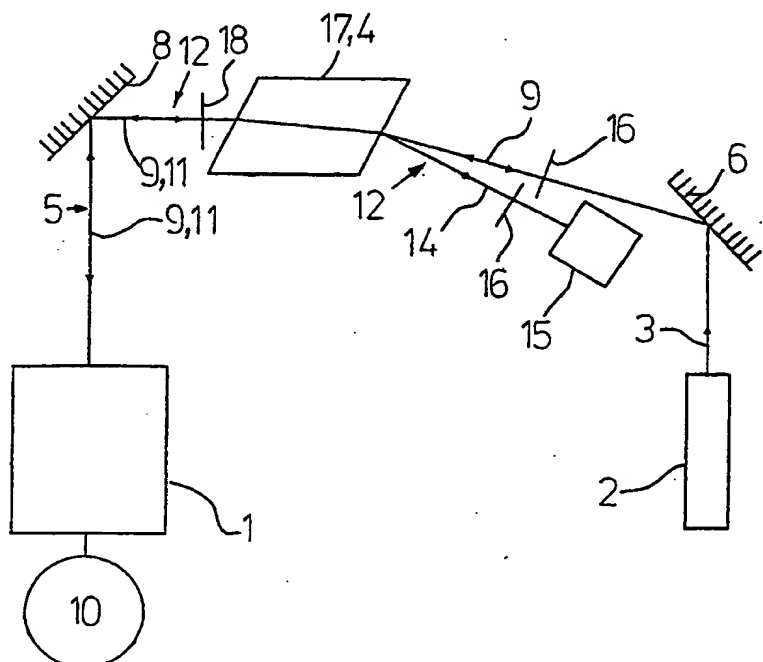
<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G02B 21/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/42884</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. August 1999 (26.08.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00459</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Februar 1999 (19.02.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 06 867.0 19. Februar 1998 (19.02.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG GMBH [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 518, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ENGELHARDT, Johann [DE/DE]; Schiessmauerweg 6, D-76669 Bad Schönborn (DE). BRADL, Joachim [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 33, D-69198 Schriesheim (DE). ULRICH, Heinrich [DE/DE]; Langgewann 2, D-69121 Heidelberg (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	

(54) Title: **OPTICAL ARRANGEMENT WITH A SPECTRALLY SELECTIVE ELEMENT**

(54) Bezeichnung: **OPTISCHE ANORDNUNG MIT SPEKTRAL SELEKTIVEM ELEMENT**

(57) Abstract

The invention relates to an optical arrangement which is situated in the beam path of a light source suited for fluorescence activation, preferably in the beam path of a confocal laser scanning microscope. The inventive optical arrangement comprises at least one spectrally selective element (4) for injecting the activation light (3) of at least one light source (2) in the microscope and for extracting the activation light (3) or the activation wavelength, said activation light or activation wavelength being scattered and reflected on the object, from the light (13) coming from the object (10) via the detection beam path (12). In order to provide an optical arrangement having a variable arrangement with the simplest construction, activation light (3, 9) of different wavelengths can be extracted by the spectrally selective element (4). Alternatively, such an optical arrangement is characterized in that the spectrally selective element (4) can be adjusted to the activation wavelength which is to be extracted.



(57) Zusammenfassung

Eine optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, mit mindestens einem spektral selektiven Element (4) zum Einkoppeln des Anregungslichts (3) mindestens einer Lichtquelle (2) in das Mikroskop und zum Ausblenden des am Objekt gestreuten und reflektierten Anregungslichts (3) bzw. der Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang (12) vom Objekt (10) kommenden Licht (13), ist zur variablen Ausgestaltung bei einfachster Konstruktion dadurch gekennzeichnet, daß durch das spektral selektive Element (4) Anregungslicht (3, 9) unterschiedlicher Wellenlängen ausblendbar ist. Alternativ ist eine solche optische Anordnung dadurch gekennzeichnet, daß das spektral selektive Element (4) auf die auszublendene Anregungswellenlänge einstellbar ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

OPTISCHE ANORDNUNG MIT SPEKTRAL SELEKTIVEM ELEMENT

Die Erfindung betrifft eine optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, mit mindestens einem spektral
5 selektiven Element zum Einkoppeln des Anregungslichts mindestens einer Lichtquelle in das Mikroskop und zum Ausblenden des am Objekt gestreuten und reflektierten Anregungslichts bzw. der Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang vom Objekt kommenden Licht.

Sowohl bei der konventionellen wie auch bei der konfokalen Laser-Scanning-
10 Mikroskopie werden in den Strahlengang einer für Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle Farbstrahlteiler mit einer ganz besonderen Transmissions- und Reflexionscharakteristik verwendet. Dabei handelt es sich ganz überwiegend um dichroitische Strahlteiler. Mit einem solchen Element wird die Fluoreszenzanregungswellenlänge λ_{III1} (bzw. λ_{III2} , λ_{III3} , ..., $\lambda_{III n}$ bei der
15 Verwendung von mehreren Lasern) in den Beleuchtungsstrahlengang reflektiert, um die Fluoreszenzverteilung im Objekt anzuregen und dann zusammen mit dem am Objekt gestreuten und reflektierten Anregungslicht den Strahlengang bis hin zum Farbstrahlteiler zu durchlaufen. Das Anregungslicht mit den Wellenlängen λ_{III1} , λ_{III2} , λ_{III3} , ..., $\lambda_{III n}$ wird am Farbstrahlteiler zurück in den
20 Laser reflektiert, nämlich aus dem Detektionsstrahlengang heraus. Das Fluoreszenzlicht mit den Wellenlängen λ_{flu01} , λ_{flu02} , λ_{flu03} , ..., $\lambda_{flu0 n}$ passiert den Farbstrahlteiler und wird – gegebenenfalls nach weiterer spektraler Aufteilung – detektiert.

Farbstrahlteiler sind üblicherweise durch ein Interferenzfilter realisiert und
25 werden je nach den verwendeten Wellenlängen für die Anregung bzw. für die Detektion gezielt bedampft. An dieser Stelle sei angemerkt, daß gemäß voranstehender Beschreibung des Standes der Technik unter einem Dichroit ein Wellenlängen-separierbares Element verstanden wird, welches das Licht unterschiedlicher Wellenlänge aufgrund der Wellenlänge und nicht aufgrund der
30 Polarisation trennt.

In der Praxis ist die Verwendung von Farbstrahlteilern zunächst einmal insoweit nachteilig, als es sich hierbei um in der Herstellung aufwendige und daher teure optische Bausteine handelt. Des weiteren ist nachteilig, daß Farbstrahlteiler eine feste Wellenlängencharakteristik aufweisen und daher nicht mit beliebiger Flexibilität hinsichtlich der Wellenlänge des Anregungslichts verwendet werden können. Bei einem Wechsel der Wellenlänge des Anregungslichts müssen auch die Farbstrahlteiler ausgewechselt werden, so beispielsweise bei einer Anordnung mehrerer Farbstrahlteiler in einem Filterrad. Dies ist abermals aufwendig und daher teuer und erfordert im übrigen eine ganz besondere Justage der einzelnen Farbstrahlteiler.

Die Verwendung eines Farbstrahlteilers bringt den weiteren Nachteil mit sich, daß durch Reflexion bedingte Lichtverluste auftreten, insbesondere Lichtverluste von Fluoreszenzlicht, welches gerade detektiert werden soll. Der spektrale Transmissions-/Reflexionsbereich ist bei Farbstrahlteilern recht breit ($\lambda_{III} \pm 20 \text{ nm}$) und keineswegs ideal „steil“. Folglich läßt sich das Fluoreszenzlicht aus diesem spektralen Bereich nicht ideal detektieren.

Bei Verwendung von Farbstrahlteilern ist die Anzahl der gleichzeitig einkoppelbaren Laser begrenzt, nämlich beispielsweise auf die Anzahl der in einem Filterrad angeordneten und kombinierbaren Farbstrahlteiler. Üblicherweise werden maximal drei Laser in den Strahlengang eingekoppelt. Wie bereits zuvor ausgeführt, müssen sämtliche Farbstrahlteiler, also auch die in einem Filterrad angeordneten Farbstrahlteiler, exakt justiert werden, was einen ganz erheblichen Aufwand in der Handhabung mit sich bringt. Alternativ können geeignete Neutralstrahlteiler eingesetzt werden, die das Fluoreszenzlicht gemeinsam mit dem am Objekt gestreuten/reflektierten Anregungslicht effizient zum Detektor leiten. Die Verluste bei der Lasereinkopplung sind dabei jedoch erheblich.

Zur Dokumentation des Standes der Technik wird lediglich beispielhaft auf die DE 196 27 568 A1 verwiesen, die eine optische Anordnung zur konfokalen Mikroskopie zeigt. Dabei handelt es sich im Konkreten um eine Anordnung zur zeitgleichen konfokalen Beleuchtung einer Objektebene mit einer Vielzahl

geeignet divergierender Leuchtpunkte sowie zugehörigen Abbildungsgliedern und einer Vielzahl von Pinholes zur konfokalen kontrastreichen Abbildung in einem Beobachtungsgerät, wobei es sich dabei um ein Mikroskop handeln
5 kann. Die Einkopplung mehrerer Lichtquellen erfolgt dort über ein diffraktives Element. Mehrere optische Teileremente bzw. Farbstrahlteiler sind im Detektionsstrahlengang angeordnet, wodurch sich ein ganz erheblicher apparativer Aufwand ergibt.

Hinsichtlich der Verwendung aktiver optischer Elemente im Strahlengang eines
10 Laser-Scanning-Mikroskops wird ergänzend auf die US 4,827,125 und die US 5,410,371 verwiesen, wobei diese Druckschriften die grundsätzliche Verwendung eines AOD (Acousto-Optical-Deflector) und eines AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) zeigen, und zwar stets mit dem Zweck, einen Strahl abzulenken oder abzuschwächen.

15 Der vorliegenden Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, eine optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, derart auszugestalten und weiterzubilden, daß das Einkoppeln des Anregungslichts unterschiedlicher Anregungswellenlänge möglich ist, ohne bei
20 einem Wechsel der Wellenlänge des Anregungslichts einen Wechsel oder eine besondere Justage der dort verwendeten optischen Elemente vornehmen zu müssen. Des weiteren soll die Anzahl der erforderlichen optischen Elemente weitestmöglich reduziert sein. Schließlich soll eine ideale Detektion des Fluoreszenzlichts möglich sein.

25 Die erfindungsgemäße optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale der nebengeordneten Patentansprüche 1 und 2. Danach ist eine gattungsgemäße optische Anordnung dadurch gekennzeichnet, daß durch

das spektral selektive Element Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlängen ausblendbar sowie entsprechend einkoppelbar ist. Alternativ ist die optische Anordnung dadurch gekennzeichnet, daß das spektral selektive Element auf die auszubblendende Anregungswellenlänge einstellbar ist.

Erfindungsgemäß ist erkannt worden, daß man im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, insbesondere im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, den dort bislang verwendeten Farbstrahlteiler durch ein ganz besonderes spektral selektives Element ersetzen kann, nämlich durch ein spektral selektives Element, welches geeignet ist, Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlängen auszublenden oder einzublenden bzw. einzukoppeln. Dieses spektral selektive Element dient einerseits zum Einkoppeln des Anregungslichts mindestens einer Lichtquelle in das Mikroskop und andererseits zum Ausblenden des am Objekt gestreuten und reflektierten Anregungslichts bzw. der entsprechenden Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang vom Objekt kommenden Licht. Insoweit kommt dem spektral selektiven Element eine Doppelfunktion zu, wobei beide Funktionen quasi zwangsgekoppelt sind.

Alternativ zu der Fähigkeit des spektral selektiven Elements, Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlängen ausblenden zu können, ist das spektral selektive Element auf die jeweils einzublendende oder auszublendende Anregungswellenlänge einstellbar. Auch insoweit ist aufgrund der voranstehend geschilderten Doppelfunktion eine Zwangskopplung auf einfache Weise gewährleistet, nämlich dadurch, daß mit Hilfe des spektral selektiven Elements das Anregungslicht in den Beleuchtungsstrahlengang einkoppelbar und daß exakt die Wellenlänge des Anregungslichts, nämlich die Anregungswellenlänge, aufgrund der hier vorgesehenen Einstellbarkeit aus dem über den Detektionsstrahlengang vom Objekt kommenden Licht ausblendbar ist, so daß zur Detektion das vom Objekt kommende Detektionslicht (=Fluoreszenzlicht) verbleibt.

In vorteilhafter Weise kann es sich bei dem spektral selektiven Element – zur Begünstigung der voranstehend erörterten Doppelfunktion – um ein passives

Element bzw. Bauteil handeln. Dazu könnte das spektral selektive Element als transparentes optisches Gitter oder als holographisches Element ausgeführt sein. Ebenso ist es denkbar, das spektral selektive Element als passiven AOD (Acousto-Optical-Deflector) oder als passiven AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) auszuführen.

In ganz besonders vorteilhafter Weise, nämlich zur konkreten Realisierung der Einstellbarkeit des spektral selektiven Elements auf die auszublendende Anregungswellenlänge, kann es sich bei dem spektral selektiven Element um ein aktives Bauteil handeln, so bspw. um ein akustooptisch und/oder elektrooptisch arbeitendes Element. Im Konkreten kommt hier als spektral selektives Element ein AOD (Acousto-Optical-Deflector) oder ein AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) in Frage.

Anstelle des im Stand der Technik üblichen Farbstrahlteilers wird hier ein aktives spektral selektives Element verwendet, so beispielsweise ein AOD oder ein AOTF. Die Aufgabe dieser aktiven Bauteile besteht darin, das Anregungslicht der Lichtquelle bzw. des Lasers oder der Laser λ_{i11} , λ_{i12} , λ_{i13} , ..., λ_{i1n} in den Beleuchtungsstrahlengang und somit in das Mikroskop einzukoppeln, um danach per Beam-Scanning die Fluoreszenzverteilung im Objekt anzuregen. Bei der Detektion kann das vom Objekt kommende Fluoreszenzlicht nahezu ungestört das aktive spektral selektive Element passieren. Dabei wird das vom Objekt gestreute oder reflektierte Licht mit den Anregungswellenlängen der Lichtquelle bzw. des Lasers oder der Laser aus dem Detektionsstrahlengang weitgehend herausreflektiert.

Zur Einkopplung einer Lichtquelle bzw. eines Lasers oder mehrerer Laser mit verschiedenen Wellenlängen λ_{i11} , λ_{i12} , ..., λ_{i1n} kann ein AOD mit entsprechenden Frequenzen ν_1 , ν_2 , ..., ν_n vorzugsweise simultan beschaltet werden, so daß die verschiedenen Laserstrahlen nach dem Durchgang durch den AOD coaxial mit der optischen Achse verlaufen. Hinsichtlich der Verwendung des AOD ist wesentlich, daß dort eine Frequenz ν_n eine Wellenlänge λ_{i1n} selektiert, die aus dem eigentlichen Strahlengang abgelenkt wird. Der Ablenkungswinkel ϕ ist dabei durch die Formel

$$\phi = \lambda_{\text{illn}} v_n / 2f$$

- definiert, wobei f die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Schallwelle im AOD ist. Das zu detektierende Fluoreszenzlicht mit einer spektralen Verteilung um die Wellenlängen $\lambda_{\text{flu01}}, \lambda_{\text{flu02}}, \dots, \lambda_{\text{flu0n}}$ zusammen mit dem am Objekt gestreuten bzw. reflektierten Anregungslicht mit den Wellenlängen $\lambda_{\text{ill1}}, \lambda_{\text{ill2}}, \dots, \lambda_{\text{illn}}$ durchläuft nun den AOD in umgekehrter Richtung. Jedoch wird gemäß der Umkehrbarkeit des Lichtwegs das Anregungslicht mit den Wellenlängen $\lambda_{\text{ill1}}, \lambda_{\text{ill2}}, \dots, \lambda_{\text{illn}}$ wegen der spezifischen Einstellung des AOD aus dem Detektionsstrahlengang in Richtung des Lasers abgelenkt (1. Ordnung). Somit kann das „spektral verbleibende“ Fluoreszenzlicht um die Wellenlängen $\lambda_{\text{flu01}}, \lambda_{\text{flu02}}, \dots, \lambda_{\text{flu0n}}$ - verglichen mit einem herkömmlichen Farbstrahlteiler - auf verbesserte Weise detektiert werden (0. Ordnung). Dadurch läßt sich jedenfalls die Justage der Einkopplung unterschiedlicher Laser einfacher als im Stand der Technik (dort unter Anwendung herkömmlicher Farbstrahlteiler in einem Filterrad) vornehmen.

In weiter vorteilhafter Weise könnte ein Nachschalten weiterer AOTF die einzelnen Wellenlängen in ihrer Leistung nach der Strahlzusammenführung selektiv regeln.

- Zur Einkopplung einer Laserlichtquelle mit verschiedenen Wellenlängen $\lambda_{\text{fil1}}, \lambda_{\text{fil2}}, \dots, \lambda_{\text{filn}}$ kann ein AOTF mit entsprechenden Frequenzen v_1, v_2, \dots, v_n simultan geschaltet sein, so daß die verschiedenen Wellenlängen in ihrer Anregungsleistung variieren und auf die Anwendung hin optimierbar sind. Die Zuführung des Laserlichts kann mittels Lichtleitfaser erfolgen.

- Jedenfalls wird die Lichtquelle bzw. der Laser coaxial aus der Richtung der 1. Ordnung des Kristalls eingekoppelt. Das zu detektierende Fluoreszenzlicht mit einer spektralen Verteilung um die Wellenlängen $\lambda_{\text{flu01}}, \lambda_{\text{flu02}}, \dots, \lambda_{\text{flu0n}}$ gemeinsam mit dem am Objekt gestreuten bzw. reflektierten Anregungslicht mit den Wellenlängen $\lambda_{\text{fil1}}, \lambda_{\text{fil2}}, \dots, \lambda_{\text{filn}}$ durchlaufen nun den AOTF in umgekehrte Richtung. Gemäß der Umkehrbarkeit des Lichtwegs wird das Anregungslicht mit den Wellenlängen $\lambda_{\text{fil1}}, \lambda_{\text{fil2}}, \dots, \lambda_{\text{filn}}$ wegen der spezifischen Einstellung des

AOTF aus dem Detektionsstrahlengang in Richtung der Lichtquelle bzw. des Lasers abgelenkt. Somit kann auch hierbei das „spektral verbleibende“ Fluoreszenzlicht um die Wellenlängen λ_{flu01} , λ_{flu02} , ..., λ_{flu0n} in einer – verglichen
5 zum herkömmlichen Farbstrahlteiler – verbesserten Weise detektiert werden (0. Ordnung).

Sowohl unter Verwendung eines AOD oder AOTF als auch unter Verwendung eines transparenten Gitters wird sich das Fluoreszenzlicht nach dem Durchgang durch das jeweilige aktive Element aufgrund der auftretenden Dispersion
10 spektral auffächern. Insoweit ist es von Vorteil, ein oder mehrere entsprechende „inverse“ Elemente nachzuschalten, so daß die ungewünschte spektrale Auffächerung wieder rückgängig gemacht wird. Auch ist es denkbar, weitere optische Elemente zur Fokussierung oder zum Ausblenden unerwünschter Strahlanteile dem jeweiligen Element (AOD, AOTF oder transparentes Gitter)
15 vor- bzw. nachzuschalten. Der dadurch wiedervereinigte Detektionsstrahl kann dann in herkömmlicher Weise durch nachgeschaltete Farbstrahlteiler spektral zerlegt und auf die verschiedenen Detektoren abgebildet werden.

Grundsätzlich ist eine Anordnung im Sinne eines „Multibanddetektor“ denkbar. Hierzu wird auf die Patentanmeldung DE 43 30 347.1-42 verwiesen, deren
20 Inhalt hier ausdrücklich hinzugezogen und insoweit als bekannt vorausgesetzt wird. Zwischen der Scan-Einheit und dem AOD bzw. dem transparenten Gitter (bei mehreren Lichtquellen bzw. Lasern mehrerer Wellenlängen) bzw. dem AOTF (bei einer Lichtquelle bzw. einem Laser mit verschiedenen Wellenlängen) ist das Anregungs-Pinhole angeordnet, wobei dieses identisch mit dem
25 Detektions-Pinhole ist. In vorteilhafter Weise wird dabei die Eigenschaft des Kristalls, den Lichtstrahl der 0. Ordnung durch den Prismeneffekt spektral aufzufächern, zur Detektion genutzt. Das dispersive Element des Multibanddetektors ist dabei mit dem Farbstrahlteiler zu einem Bauteil vereinigt, wodurch alle weiteren, dem herkömmlichen Detektionsstrahlengang
30 nachgeordneten und mit weiteren Verlusten in der Fluoreszenzintensität behafteten Farbstrahlteiler entfallen.

In ganz besonders vorteilhafter Weise kann die voranstehend erörterte Technik in Kombination mit einer in der Wellenlänge variabel durchstimmbaren Laserlichtquelle - z.B. Farbstofflaser, OPO (optisch parametrisierter Oszillator), Elektronenstrahlkollisionslichtquelle - äußerst flexible Fluoreszenzmikroskopie-
5 Anwendungen ermöglichen. Die Einstellung bzw. Kontrolle der Anregungswellenlänge kann direkt mit der Ansteuereinheit eines der zuvor beschriebenen spektral selektiven Elemente gekoppelt sein, so daß nur diese Anregungswellenlänge coaxial in den Anregungsstrahlengang des Mikroskops
10 eingekoppelt und wiederum nur diese Wellenlänge aus dem Detektionsstrahlengang ausgeblendet wird. Die Kopplung bzw. Zwangskopplung der Lichtquelle mit dem strahlteilenden Element kann entweder manuell oder automatisch oder gar nach einer vorgebbaren Vorschrift erfolgen, wobei diese Möglichkeit dem jeweiligen Anforderungsprofil
15 anzupassen ist. beispielsweise kann nach jeder gescannten Bildebene die Anregungswellenlänge sowie der Strahlteiler in geeigneter Weise verändert werden. Somit lassen sich Mehrfarbenfluoreszenzobjekte detektieren. Eine zeilenweise Umschaltung ist ebenso denkbar.

Zusammenfassend lassen sich die Vorteile der erfindungsgemäßen Lehre nebst
20 vorteilhafter Ausgestaltung wie folgt zusammenfassen:

Die spektral selektiven Elemente sind für alle Wellenlängen außer für die selektierten Anregungswellenlängen $\lambda_{111}, \lambda_{112}, \dots, \lambda_{11n}$ „transparent“. Der „spektrale Verlust“ ist minimal, da vom spektral selektiven Element nur der selektierte spektrale Bereich von typischerweise $\lambda_{11n} \pm 2$ nm abgelenkt wird.
25 Dadurch wird der spektrale Bereich für die Detektion vergrößert. Somit können nahezu beliebig viele unterschiedliche Wellenlängenbereiche simultan eingekoppelt und genutzt werden. Die spektral „verlorene“ Fluoreszenzintensität, die durch die spektral selektiven Elemente bedingt ist, ist geringer als bei herkömmlichen Farbstrahlteilern. Mit anderen Worten liegen hier
30 reduzierte Intensitätsverluste im interessierenden Bereich vor. Die aktiven spektral selektiven Elemente sind flexibel einstellbar, so daß prinzipiell beliebig viele Lichtquellen bzw. Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen auch simultan in das Mikroskop einkoppelbar sind. Dies ermöglicht die verbesserte

Anwendung bei Multi-Color FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung). Folglich ist dann nur noch eine Limitierung der spektralen Aufspaltung des Fluoreszenzlichts, bspw. durch „Cross-Talk“, gegeben. Herkömmliche Sperrfilter können komplett entfallen, so daß weitere Verluste von Fluoreszenzlicht in der Detektion vermieden sind.

Schließlich ist es auch denkbar, daß ein anderes aktives holographisches Element dem spektral selektiven Element nachgeschaltet ist und dabei die Aufgabe des Strahlscanners ausübt. Beide Elemente können zu einem einzigen Bauteil zusammengefaßt sein.

Grundsätzlich lassen sich unterschiedliche Lichtquellen verwenden, solange sie zur Fluoreszenzanregung geeignet sind. So kommt bspw. eine Weißlichtquelle, eine Lichtquelle zur Verwendung eines optisch parametrisierten Oszillators, eine Elektronenstrahlkollisionslichtquelle oder eine Laserlichtquelle in Frage, wobei die Laserlichtquelle in der Wellenlänge variabel durchstimmbar sein kann. Laserlichtquellen mit verschiedenen Wellenlängen oder eine mehrere Laser umfassende Lichtquelle ist bzw. sind verwendbar.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die den Patentansprüchen 1 und 2 nachgeordneten Patentansprüche, andererseits auf die nachfolgende Erläuterung bevorzugter Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigen

Fig. 1 in einer schematischen Darstellung eine gattungsbildende optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops zur Dokumentation des der Erfindung zu grundlegenden Standes der Technik,

- Fig. 2 in einer schematischen Darstellung ein erstes Ausführungsbei
- 5 Fig. 3 in einer schematischen Darstellung ein zweites Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen optischen Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, wobei dort drei Laser mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen einkoppelbar sind,
- 10 Fig. 4 in einer schematischen Darstellung ein drittes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen optischen Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, wobei dort die Einkopplung von drei Laserlichtquellen über ein transparentes Gitter erfolgt,
- 15 Fig. 5 in schematischer Darstellung, vergrößert und teilweise, den Beleuchtungsstrahlengang und Detektionsstrahlengang, wobei dem aktiven spektral selektiven Element zur Strahlzusammenführung dienende Mittel nachgeschaltet sind,
- 20 Fig. 6 in schematischer Darstellung, vergrößert und teilweise, den Beleuchtungsstrahlengang und Detektionsstrahlengang, wobei dort eine Dispersionskorrektur erfolgt,
- Fig. 7 in einer schematischen Darstellung die prinzipielle Funktionsweise eines AOD oder AOTF,
- 25 Fig. 8 in einer schematischen Darstellung ein weiteres Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen optischen Anordnung, wobei dort eine zusätzliche spektrale Auffächerung vor einem Multibanddetektor stattfindet und

Fig. 9 in einer schematischen Darstellung das Ausführungsbeispiel aus Fig. 8, wobei dort im Detektionsstrahlengang vor dem Multibanddetektor ein variables Spaltfilter angeordnet ist.

- 5 Fig. 1 dokumentiert den Stand der Technik und zeigt dabei eine herkömmliche optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, wobei es sich hier um eine optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops handelt. Der Laserscanner 1 ist dabei lediglich symbolisch dargestellt. Bei der den Stand der
- 10 Technik betreffenden Darstellung sind als Lichtquellen insgesamt drei Laser 2 vorgesehen, die mit ihrem Anregungslicht 3 über spektral selektive Elemente 4 in den Beleuchtungsstrahlengang 5 des Mikroskops einkoppeln. Bei den spektral selektiven Elementen 4 handelt es sich im Konkreten um einen Spiegel 6 sowie um Farbstrahlteiler 7. Jedenfalls wird das Anregungslicht 3 in den
- 15 Beleuchtungsstrahlengang 5 eingekoppelt und gelangt über einen weiteren Spiegel 8 als Anregungslicht 9 zum Laserscanner 1.

- Das von dem ebenfalls lediglich symbolisch dargestellten Objekt 10 zurückkommende Licht – hier handelt es sich um das am Objekt gestreute und reflektierte Anregungslicht 9 einerseits und um das vom Objekt 10 ausgesandte
- 20 Fluoreszenzlicht 11 – gelangt über den Spiegel 8 zu dem spektral selektiven Element 4, wobei es sich hier um den Farbstrahlteiler 7 handelt. Von dort aus wird das Anregungslicht 9 bzw. die Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang 12 vom Objekt 10 kommenden Licht 13 ausgeblendet und gelangt als zurückkommendes Anregungslicht 9 zurück zu den Lasern 2:
- 25 Das durch den Farbstrahlteiler 7 nicht abgelenkte Detektionslicht 14 gelangt unmittelbar zu dem Detektor 15.

Erfindungsgemäß ist durch das spektral selektive Element 4 zurückkommendes Anregungslicht 3 unterschiedlicher Wellenlängen ausblendbar. Dies ist insbesondere in Fig. 4 dargestellt.

Alternativ – in ebenfalls erfindungsgemäßer Weise – ist das spektral selektive Element 4 auf die auszublendende Anregungswellenlänge einstellbar. Dies läßt sich den Ausführungsbeispielen aus den Fig. 2, 3 und 8, 9 besonders gut entnehmen.

Bei dem in Fig. 2 gezeigten Ausführungsbeispiel ist lediglich ein Laser 2 vorgesehen, dessen Anregungslicht 3 unterschiedliche Wellenlängen aufweisen kann. Jedenfalls gelangt das Anregungslicht 3 über einen Spiegel 6 und über ein zusätzliches optisches Element, nämlich über eine Linse 16 zu einem AOTF 17, der als spektralselektives Element arbeitet. Von dort aus gelangt das Anregungslicht 3 wiederum über ein zusätzliches optisches Element - im hier gewählten Ausführungsbeispiel eine Linse 18 - und über einen Spiegel 8 zum Laserscanner 1. Vom Objekt 10 reflektiert, gelangt das zurückkommende Licht – reflektiertes Anregungslicht 9 und Detektionslicht 11 – über den Spiegel 8 und die Linse 18 zurück in den AOTF 17 und wird dort entsprechend der Beschaltung des AOTF 17 teilweise ausgeblendet. Im Konkreten wird nämlich das Detektionslicht bzw. Fluoreszenzlicht 11 über den Detektionsstrahlengang 12 zum Detektor 15 geführt (0. Ordnung). Das zurückkommende Anregungslicht 9 wird dagegen über die Linse 16 und den Spiegel 6 zurück zum Laser 2 geführt und ist somit aus dem Detektionsstrahlengang 12 ausgeblendet.

Ähnlich verhält es sich bei dem in Fig. 3 gezeigten Ausführungsbeispiel, wobei dort gleichzeitig drei Laser 2 über zusätzliche optische Elemente, hier Linsen 16, ihr Anregungslicht 3 über ein AOD 19, eine weitere nachgeschaltete Linse 18 und einen Spiegel 8 in den Beleuchtungsstrahlengang 5 einkoppeln. Von dort aus gelangt das Anregungslicht 3 zum Laserscanner 1 und zum Objekt 10.

Das vom Objekt kommende Licht 13 umfaßt bei dem voranstehend genannten Ausführungsbeispiel Fluoreszenzlicht 11 und zurückkommendes Anregungslicht 9, wobei dort der AOD 19 das zurückkommende Fluoreszenzlicht als Detektionslicht 14 zu dem Detektor 15 führt. Das zurückkommende Anregungslicht 9 wird ausgeblendet und gelangt über Linsen 16 zu den jeweiligen Lasern 2.

Das in Fig. 4 gezeigte Ausführungsbeispiel umfaßt als spektral selektives Element 4 ein transparentes Gitter 20, wobei über das transparente Gitter 20 gleichzeitig drei Laser 2 ihr Anregungslicht 3 in den Beleuchtungsstrahlengang 5 des Mikroskops einkoppeln. Wesentlich ist hier jedenfalls, daß das transparente Gitter 20 das vom Objekt 10 zurückkommende Anregungslicht 9 aus dem

Detektionsstrahlengang ausblendet, so daß dieses Licht zurück zu den Lasern 2 gelangt. Das zu detektierende Fluoreszenzlicht 11 gelangt über den Detektionsstrahlengang 12 zum Detektor 15.

10 Fig. 5 zeigt die Möglichkeit einer Dispersionskorrektur, wobei das vom Objekt zurückkommende Licht 13 in den AOTF 17 oder AOD 19 gelangt. Dort wird das zurückkommende Detektionslicht 14 – zwangsweise – spektral aufgefächert und über nachgeschaltete Elemente – AOD/AOTF – parallelisiert und schließlich konvergiert. Das spektral vereinigte Detektionslicht 14 gelangt von dort zu dem
15 in Fig. 5 nicht gezeigten Detektor 15.

Bei der in Fig. 6 gezeigten Dispersionskorrektur wird das vom Objekt kommende Licht 13 mittels AOD 17/ AOTF 19 aufgefächert, wobei das aufgefächerte Detektionslicht 14 über ein weiteres passives spektral selektives Element 4 – AOTF 17 oder AOD 19 – über eine Linse 21 mit Feldkorrektur konvertiert und
20 durch ein Detektionsspinhole 22 oder durch einen Detektionsspalt zum Detektor 15 gelangt.

Gemäß der Darstellung in Fig. 7 handelt es sich bei dem spektral selektiven Element 4 um ein AOTF 17 oder ein AOD 19, wobei diese Elemente einen speziellen Kristall mit dispersionsfreier 0. Ordnung umfassen. Dieser Kristall
25 bzw. dieses spektral selektive Element wird über ein Piezoelement 23 angeregt bzw. beaufschlagt. Fig. 7 zeigt besonders deutlich, daß das vom Objekt kommende Licht 13 in dem AOTF 17 bzw. AOD 19 aufgespalten wird, wobei das Detektionslicht 14 als dispersionsfreies Licht 0. Ordnung ungehindert durch den Kristall läuft. Das vom Objekt zurückkommende Anregungslicht 9 wird
30 dagegen als Licht 1. Ordnung abgelenkt und zurück zu den hier nicht gezeigten

Lasern geführt.

Fig. 8 zeigt eine spezielle Detektion unter Ausnutzung der spektralen
Auffächerung des spektral selektiven Elements 4, wobei hier im Konkreten ein
5 AOTF 17 verwendet ist. Das vom Objekt 10 kommende Licht 13 wird im AOTF
17 spektral aufgespalten, wobei das Detektionslicht 14 über eine Linse 16 und
einen Spiegel 6 zu einem Multibanddetektor 24 bzw. Spektrometer gelangt. Der
Spiegel 6 führt zu einer Verlängerung der Strecke, so daß eine Auffächerung
des zurückkommenden Detektionslichts 14 bis hin zum Multibanddetektor 24
10 begünstigt wird.

Das im AOTF 17 ausgeblendete Anregungslicht 9 gelangt über die Linse 16 und
den Spiegel 8 zurück zum Laser 2.

Schließlich zeigt Fig. 9 in einer schematischen Darstellung das
Ausführungsbeispiel aus Fig. 8, wobei dort - in Ergänzung - im
15 Detektionsstrahlengang vor dem Multibanddetektor 24 ein variables Spaltfilter
25 angeordnet ist. Dieses Spaltfilter 25 ist im Detektionsstrahlengang 12
unmittelbar vor dem Detektor 15 angeordnet und im Detektionsstrahlengang
positionierbar. Desweiteren ist der Spalt 26 des Spaltfilters 25 variabel, so daß
auch insoweit eine spektrale Selektion des Detektionslichts 14 möglich ist.

20 Hinsichtlich weiterer Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Lehre, die den
Figuren nicht zu entnehmen sind, wird zur Vermeidung von Wiederholungen auf
den allgemeinen Teil der Beschreibung und die dort geschilderte
Funktionsweise der Lehre und der vorteilhaften Ausgestaltungen verwiesen.

Bezugszeichenliste

	1	Laserscanner
	2	Laser (Lichtquelle)
	3	Anregungslicht
5	4	spektral selektives Element
	5	Beleuchtungsstrahlengang
	6	Spiegel
	7	Farbstrahlteiler
	8	Spiegel
10	9	Anregungs- und Detektionslicht
	10	Objekt
	11	Fluoreszenzlicht (Detektionslicht)
	12	Detektionsstrahlengang
	13	(vom Objekt kommendes) Licht
15	14	Detektionslicht (nicht abgelenktes Detektionslicht)
	15	Detektor
	16	Linse
	17	AOTF
	18	Linse
20	19	AOD
	20	transparentes Gitter
	21	Linse (mit Feldkorrektur)
	22	Detektions-Pinhole
	23	Piezoelement
25	24	Multibanddetektor (Spektrometer)
	25	(variables) Spaltfilter
	26	Spalt (von 25)

Patentansprüche

1. Optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, mit mindestens einem spektral selektiven
5 Element (4) zum Einkoppeln des Anregungslichts (3) mindestens einer Lichtquelle (2) in das Mikroskop und zum Ausblenden des am Objekt (10) gestreuten und reflektierten Anregungslichts (3) bzw. der Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang (12) vom
10 Objekt (10) kommenden Licht (13),
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß durch das spektral selektive Element (4) Anregungslicht (3, 9) unterschiedlicher Wellenlängen ausblendbar ist.
2. Optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen
15 Laser-Scanning-Mikroskops, mit mindestens einem spektral selektiven Element (4) zum Einkoppeln des Anregungslichts (3) mindestens einer Lichtquelle (2) in das Mikroskop und zum Ausblenden des am Objekt (10) gestreuten und reflektierten Anregungslichts (3) bzw. der
20 Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang (12) vom Objekt (10) kommenden Licht (13),
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß das spektral selektive Element (4) auf die auszublendende Anregungswellenlänge einstellbar ist.
3. Optische Anordnung nach Anspruch 1, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß es sich bei dem spektral selektiven
25 Element (4) um ein passives Bauteil handelt.
4. Optische Anordnung nach Anspruch 3, **d a d u r c h g e k e n n z i c h n e t**, daß das spektral selektive Element (4) als transparentes optisches Gitter (20) ausgeführt ist.

5. Optische Anordnung nach Anspruch 3, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das spektral selektive Element (4) als
holographisches Element ausgeführt ist.
- 5 6. Optische Anordnung nach Anspruch 3, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das spektral selektive Element (4) als
passives AOD (Acousto-Optical-Deflector) (19) oder passives AOTF
(Acousto-Optical-Tunable-Filter) (17) ausgeführt ist.
- 10 7. Optische Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß es sich bei dem spektral selektiven
Element (4) um ein aktives Bauteil handelt.
8. Optische Anordnung nach Anspruch 7, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das spektral selektive Element (4)
akustooptisch und/oder elektrooptisch arbeitet.
- 15 9. Optische Anordnung nach Anspruch 8, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das spektral selektive Element (4) als
AOD (Acousto-Optical-Deflector) (19) ausgeführt ist.
- 20 10. Optische Anordnung nach Anspruch 9, wobei mehrere Lichtquellen mit
unterschiedlichen Wellenlängen einkoppelbar sind, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das AOD (19) mit entsprechenden
Frequenzen vorzugsweise simultan beschaltet ist, so daß die
verschiedenen Lichtstrahlen nach dem Durchgang des AOD (19) koaxial
mit der optischen Achse des Beleuchtungsstrahlengangs (5) sind.
- 25 11. Optische Anordnung nach Anspruch 8, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das spektral selektive Element (4) als
AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) (17) ausgeführt ist.

12. Optische Anordnung nach Anspruch 11, wobei eine Lichtquelle mit unterschiedlichen Wellenlängen einkoppelbar ist, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß das AOTF (17) mit entsprechenden Frequenzen simultan beschaltbar ist.
13. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 7 bis 12, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß das spektral selektive Element (4) derart konstruiert ist, daß eine spektrale Auffächerung des Detektionslichts (11) zumindest weitgehend vermieden ist.
14. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß zur leistungsspezifischen Regelung einzelner Wellenlängen dem spektral selektiven Element (4) mindestens ein weiteres aktives bzw. spektral selektives Element nachgeschaltet ist.
15. Optische Anordnung nach Anspruch 14, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß es sich bei dem weiteren spektral selektiven Element um ein AOD (19) handelt.
16. Optische Anordnung nach Anspruch 14, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß es sich bei dem weiteren spektral selektiven Element um ein AOTF (17) handelt.
17. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 7 bis 16, wobei das spektral selektive Element (4) eine Ansteuereinheit umfaßt, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß die Einstellung/Kontrolle der Anregungswellenlänge mit der Ansteuereinheit zwangsgekoppelt ist, so daß nur diese Anregungswellenlänge vorzugsweise koaxial in den Beleuchtungsstrahlengang (5) des Mikroskops einkoppelbar ist und ausschließlich diese Wellenlänge aus dem Detektionsstrahlengang (12) ausblendbar ist.

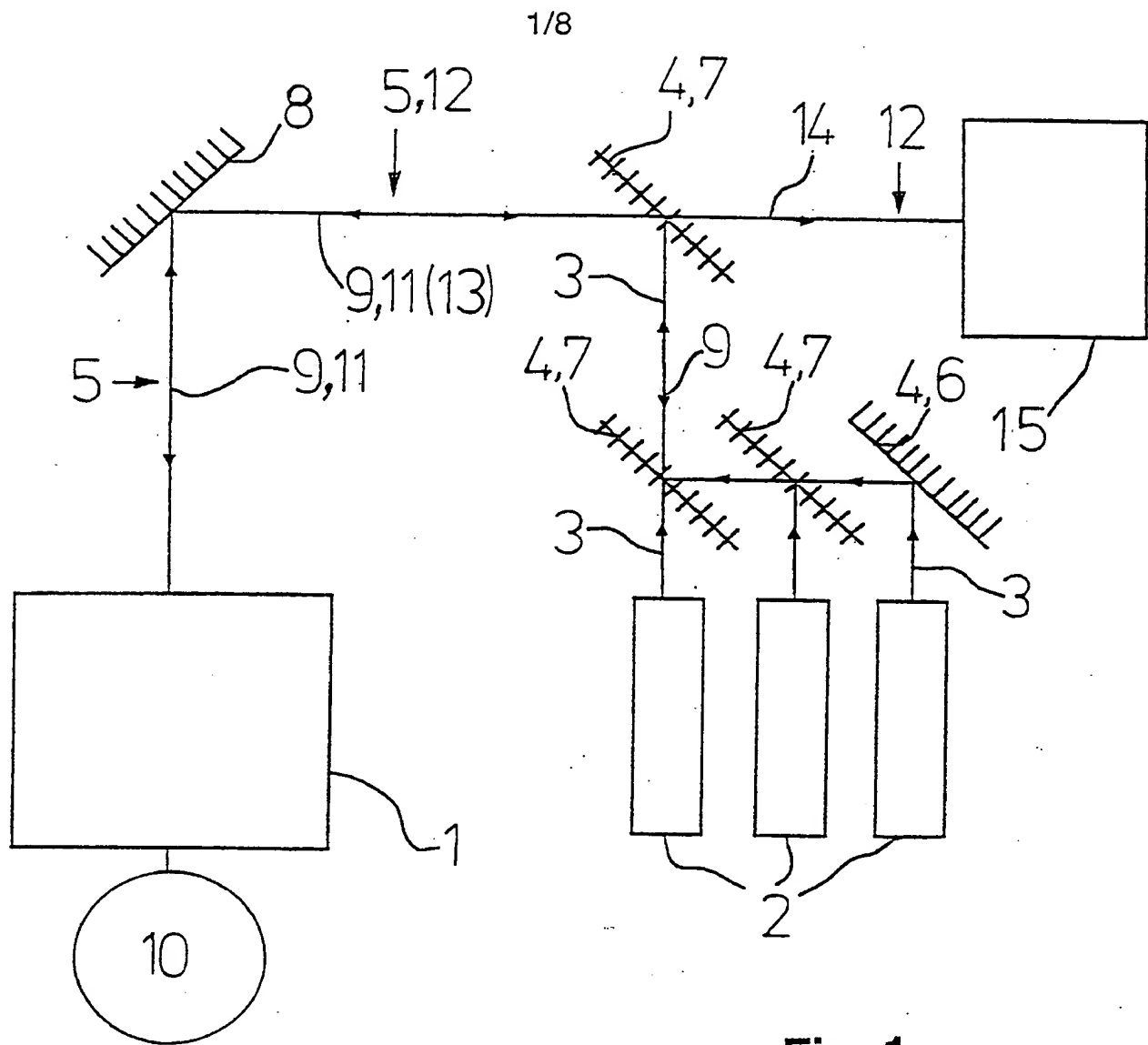
18. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Ansteuerung der Lichtquelle (2) mit
dem spektral selektiven Element (4) manuell oder automatisch erfolgt.
- 5 19. Optische Anordnung nach Anspruch 18, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Ansteuerung der Lichtquelle (2) mit
dem spektral selektiven Element (4) nach einer frei definierbaren Vorschrift
erfolgt.
- 10 20. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß dem spektral selektiven Element (4)
mindestens ein weiteres optisches Element vor- und/oder nachgeschaltet
ist.
- 15 21. Optische Anordnung nach Anspruch 20, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß ein im Beleuchtungsstrahlengang (5) dem
spektral selektiven Element (4) nachgeschaltetes aktives holographisches
Element als Strahlscanner dient.
- 20 22. Optische Anordnung nach Anspruch 21, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das spektral selektive Element (4) und das
nachgeschaltete holographische Element zu einem funktionalen Baustein
vereint sind.
- 25 23. Optische Anordnung nach Anspruch 20, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß es sich bei dem weiteren optischen
Element um ein Strahlanpassungsmittel bzw. um ein Mittel zur
Kompensation der durch das spektral selektive Element (4) verursachten
spektralen Auffächerung handelt.
24. Optische Anordnung nach Anspruch 23, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das Strahlanpassungsmittel als Linse (16)
ausgeführt ist.

25. Optische Anordnung nach Anspruch 23, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das Strahlanpassungsmittel als Prisma
ausgeführt ist.
- 5 26. Optische Anordnung nach Anspruch 23, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das Strahlanpassungsmittel als Blende,
vorzugsweise als Lochblende oder Schlitzblende, ausgeführt ist.
- 10 27. Optische Anordnung nach Anspruch 23, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das Strahlanpassungsmittel als Filter,
vorzugsweise als Sperrfilter, ausgeführt ist.
28. Optische Anordnung nach Anspruch 27, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das Filter unmittelbar vor dem Detektor
(15) angeordnet ist.
- 15 29. Optische Anordnung nach Anspruch 23, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das Strahlanpassungsmittel als
Fokussiermittel ausgeführt ist.
30. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 20 bis 29, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß als weiteres optisches Element ein
Farbstrahlteiler zur weiteren spektralen Zerlegung vorgesehen ist.
- 20 31. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 20 bis 30, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß als weiteres optisches Element
mindestens ein AOTF (17) vorgesehen ist.
- 25 32. Optische Anordnung nach Anspruch 31, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das AOTF (17) als passives Element
verwendbar ist.

33. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 20 bis 32, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß Kombinationen weiterer optischer
Elemente vorgesehen sind.
- 5 34. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 33, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß im Detektionsstrahlengang (12) Mittel zur
Mehrfachreflexion angeordnet sind, die eine Winkelvergrößerung der
Auffächerung des Detektionsstrahls herbeiführen.
- 10 35. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 34, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß im Detektionsstrahlengang (12),
vorzugsweise unmittelbar vor dem Detektor (15), ein Spaltfilter (25)
angeordnet ist.
- 15 36. Optische Anordnung nach Anspruch 35, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß das Spaltfilter (25) im
Detektionsstrahlengang (12) positionierbar ist.
37. Optische Anordnung nach Anspruch 35 oder 36, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß der Spalt (26) des Spaltfilters (25) variabel
ist.
- 20 38. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 37, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß im Detektionsstrahlengang (12) nach dem
spektral selektiven Element (4) ein Spektrometer zur Detektion der
spektralen Auffächerung angeordnet ist.
- 25 39. Optische Anordnung nach Anspruch 37, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß der Spektrometer als Multibanddetektor
(24) ausgeführt ist.

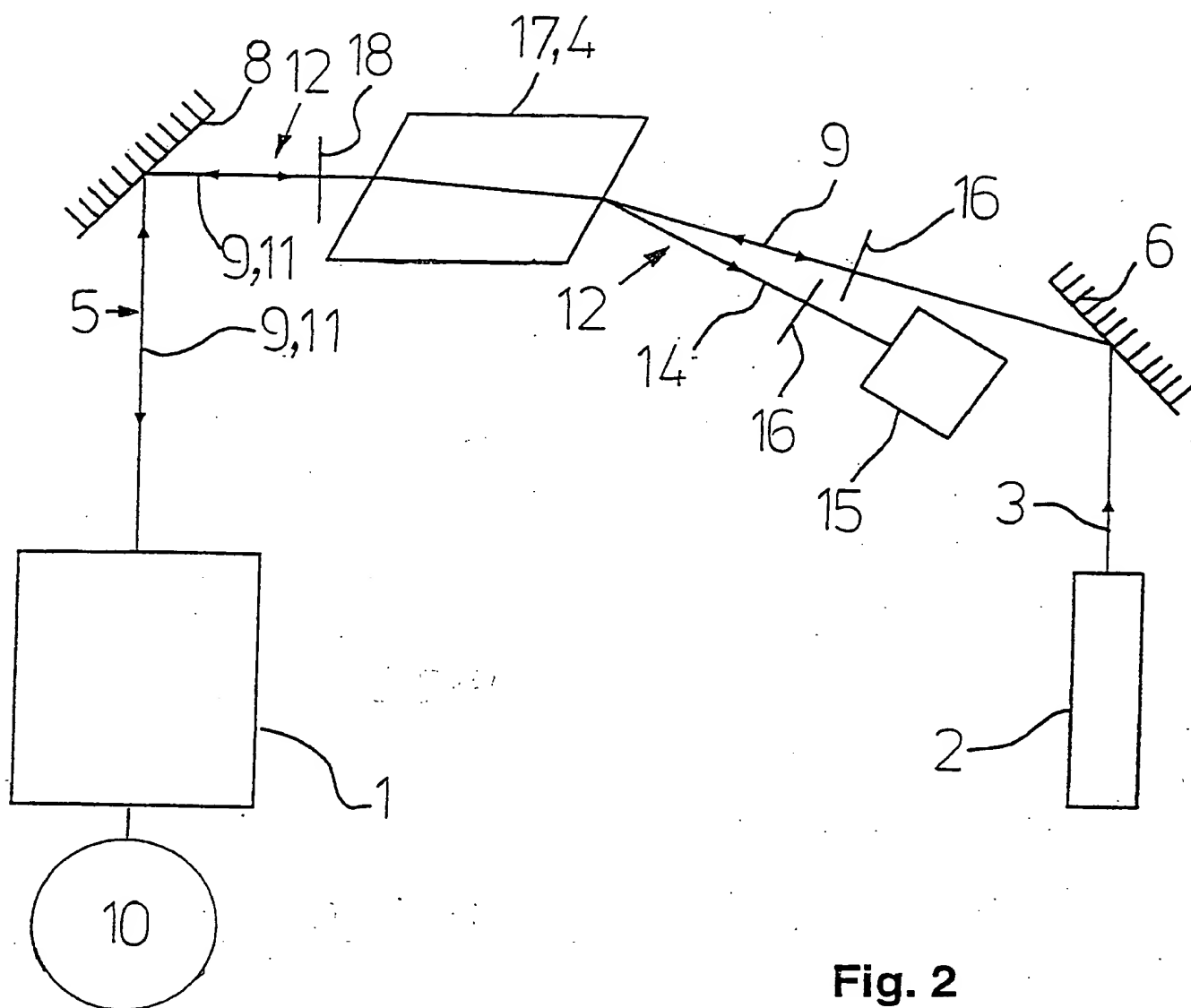
- 5 40. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 39, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß die ausgeblendeten Anregungswellenlängen in Richtung der Lichtquellen (2) aus dem Detektionsstrahlengang (12) abgelenkt werden.
41. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 40, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß die Lichtquelle (2) als Weißlichtquelle ausgeführt ist.
- 10 42. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 40, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß die Lichtquelle (2) als optisch parametrisierter Oszillator (OPO) ausgeführt ist.
43. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 40, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß die Lichtquelle (2) als Elektronenstrahlkollisionslichtquelle ausgeführt ist.
- 15 44. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 40, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß die Lichtquelle (2) als Laserlichtquelle ausgeführt ist.
- 20 45. Optische Anordnung nach Anspruch 44, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß die Laserlichtquelle in der Wellenlänge variabel durchstimmbar ist.
46. Optische Anordnung nach Anspruch 44 oder 45, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß die Laserlichtquelle einen Laser mit verschiedenen Wellenlängen umfaßt.

47. Optische Anordnung nach Anspruch 44, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Lichtquelle mehrere Laser (2) mit
unterschiedlichen Wellenlängen umfaßt.
- 5 48. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 44 bis 47, **d a d u r c h**
g e k e n n z e i c h n e t, daß der Laser (2) als Farbstofflaser ausgeführt
ist.

**Fig. 1**

Stand der Technik

2/8

**Fig. 2**

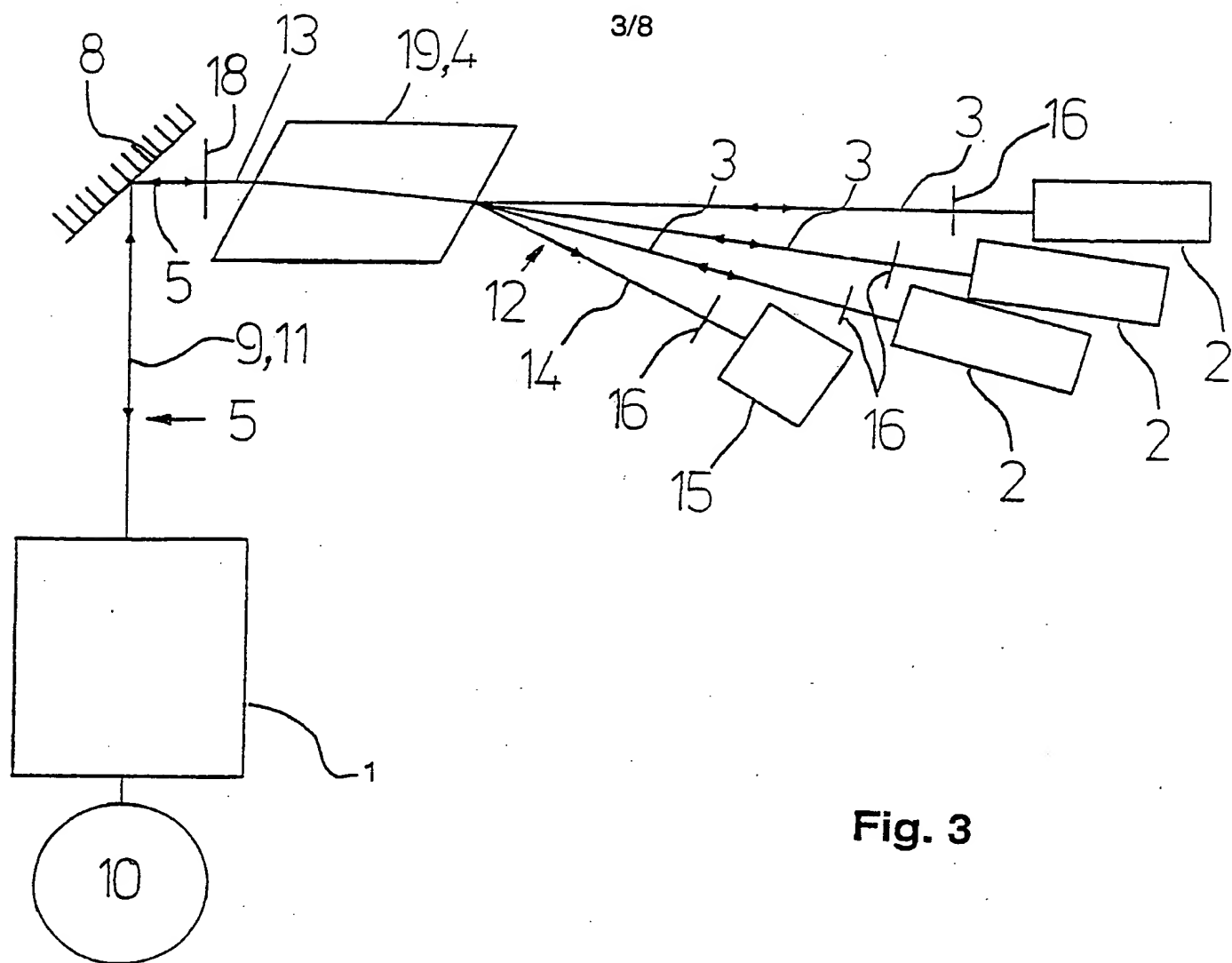
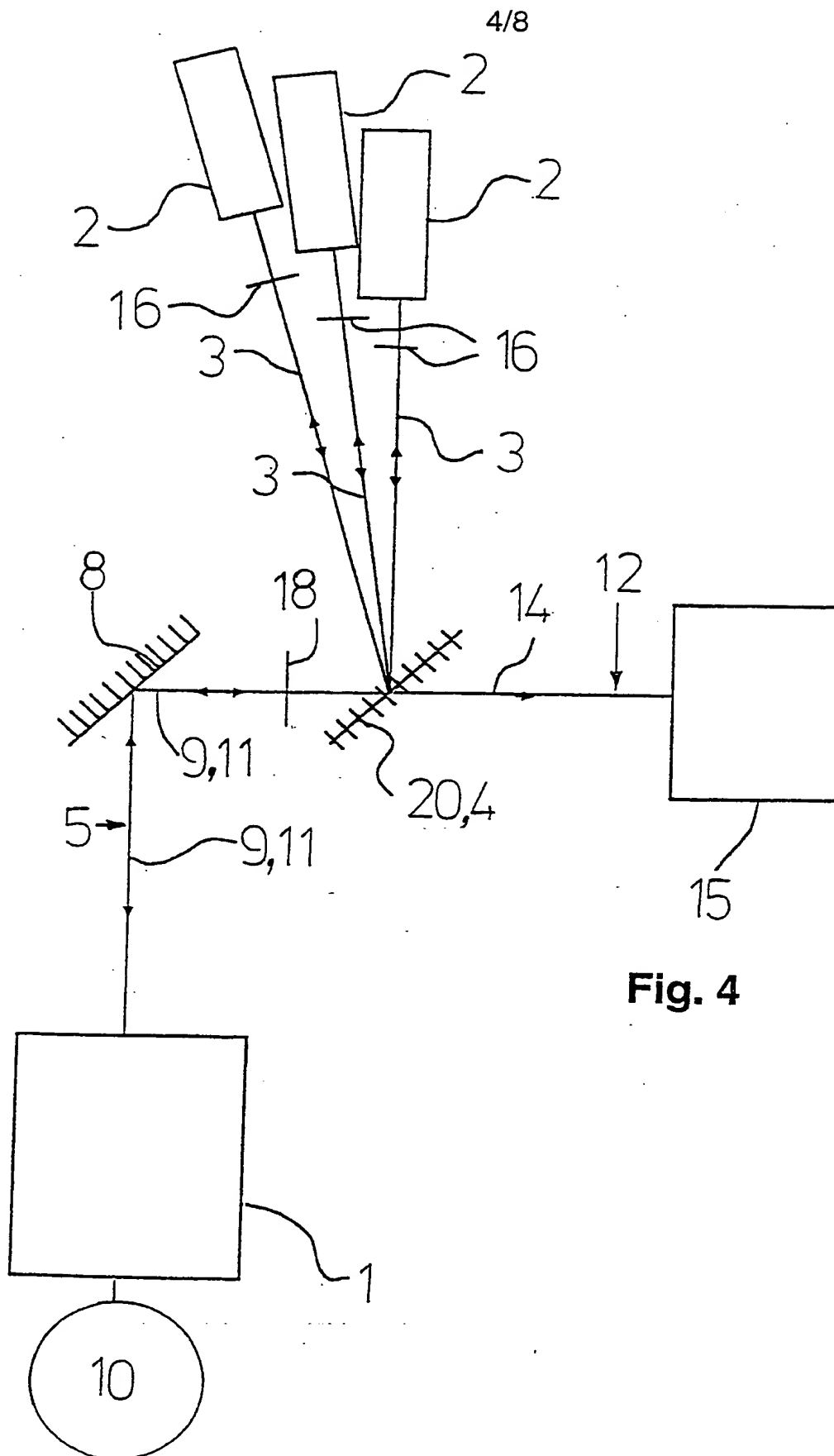


Fig. 3



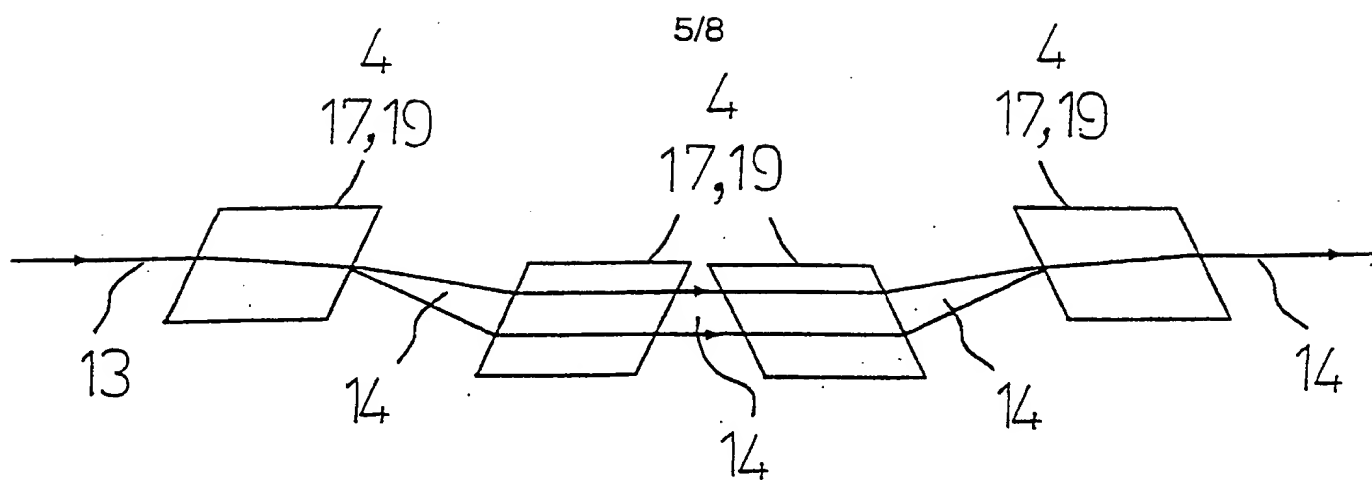


Fig. 5

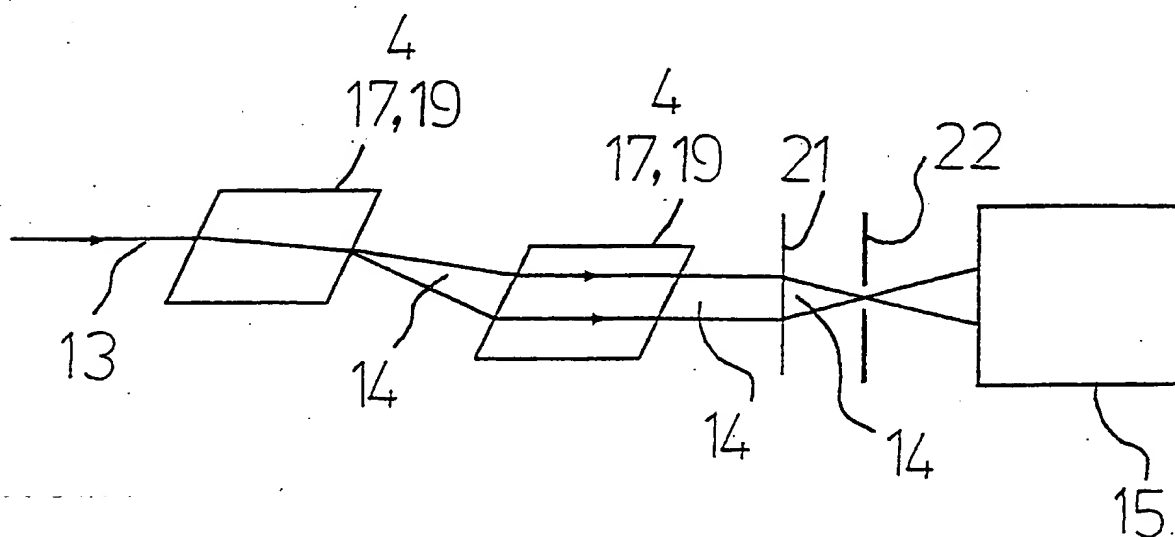
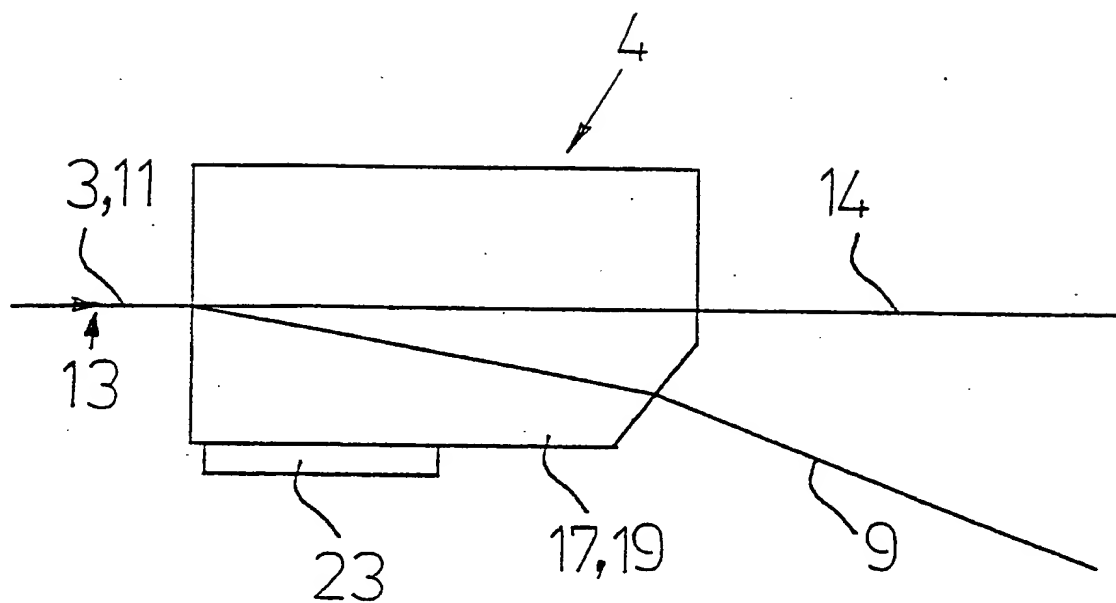
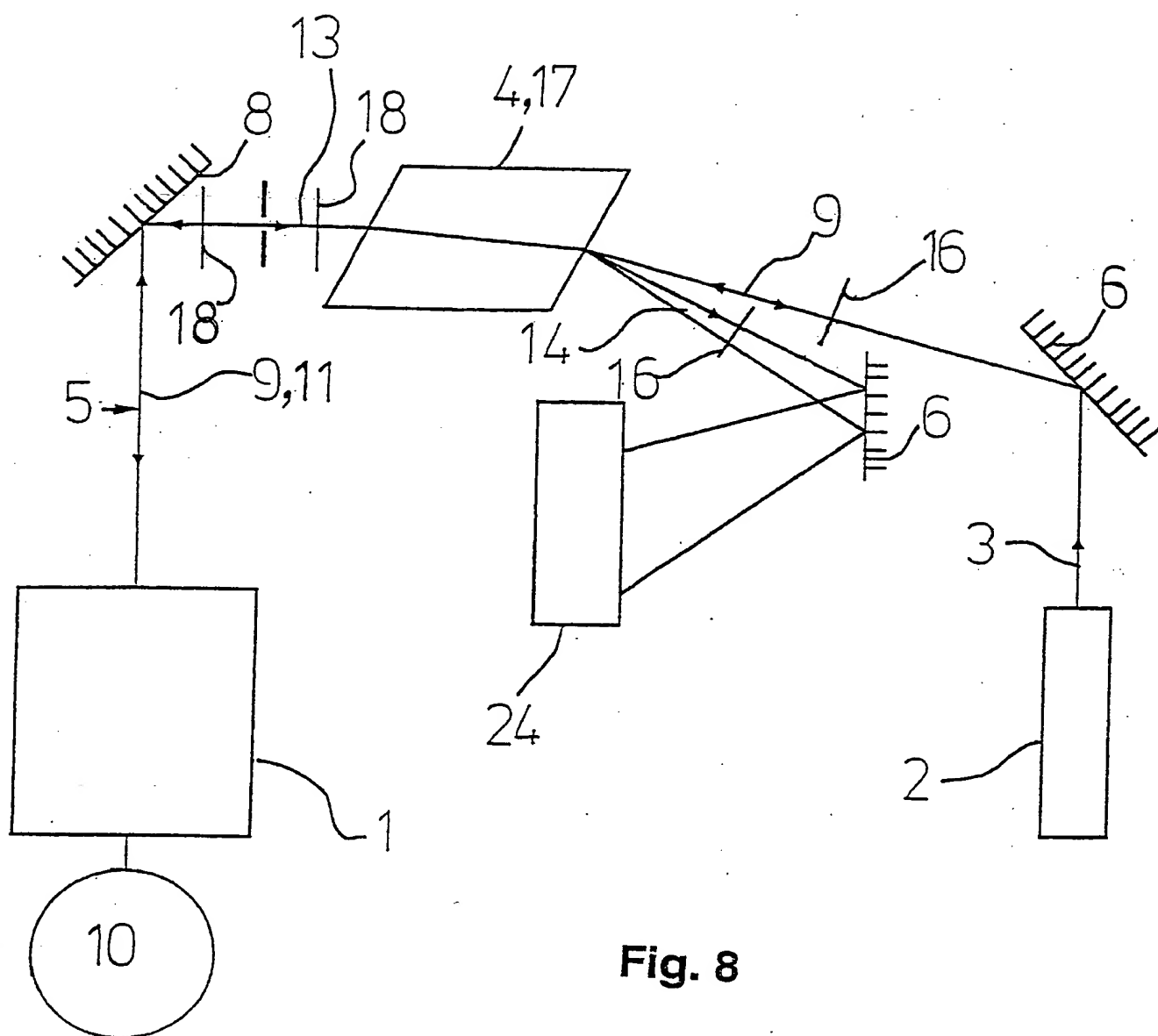


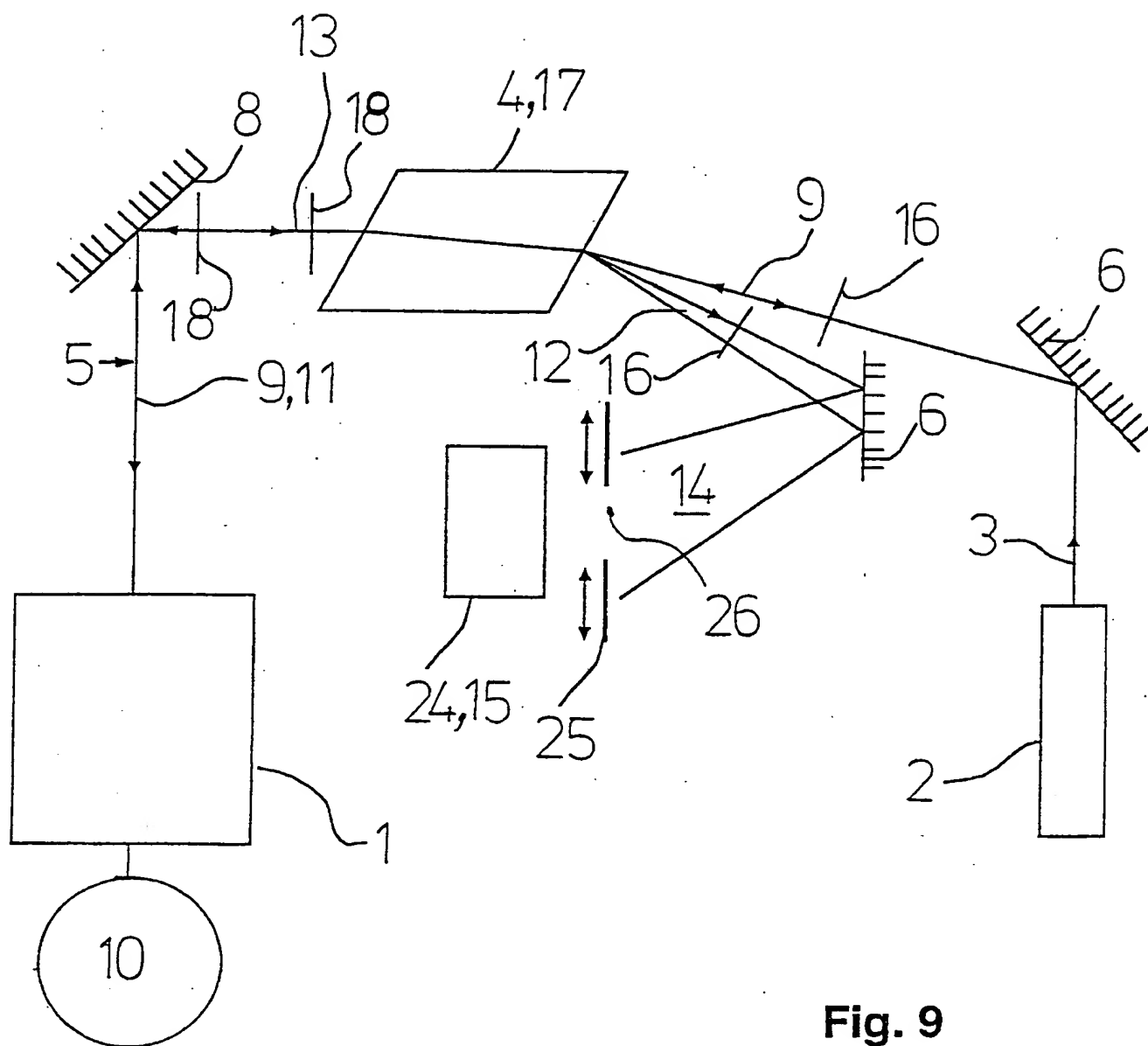
Fig. 6

6/8

**Fig. 7**

7/8

**Fig. 8**

**Fig. 9**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/00459

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G02B21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G02B G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 196 27 568 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 15 January 1998 (1998-01-15) cited in the application column 3, line 8 - line 23 column 7, line 24 - line 32; claims 1,13,20-22,24,26; figures 2C,E	1-3, 18-21, 29,33, 41,44,46
X	US 5 418 371 A (ASLUND NILS R D ET AL) 23 May 1995 (1995-05-23) column 5, line 9 - line 62; figure 1 --- -/--	1,3,14, 18-20, 23,27, 28,30,44

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 July 1999

Date of mailing of the international search report

26/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hylla, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/00459

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 18850 A (MAYO FOUNDATION) 29 October 1992 (1992-10-29) page 5, line 30 - line 34 page 7, line 1 - line 28; figure 2 ---	1,3,14, 20,23, 30,33, 40,44,47
A	WO 92 01966 A (MEDICAL RES COUNCIL) 6 February 1992 (1992-02-06) page 5, paragraph 6 - page 7, paragraph 1; figures 1,2 ---	1-3,14, 20,23, 27,28, 30,33, 40,44,47
A	EP 0 732 582 A (BIO RAD LABORATORIES) 18 September 1996 (1996-09-18) abstract; figures 11,20 column 6, line 19 - line 31 column 6, line 56 - column 7, line 9 column 7, line 47 - column 8, line 19 column 8, line 48 - line 54 ---	1-3, 17-20, 34,38, 44,45
A	WO 88 08550 A (GOLDSTEIN SETH R) 3 November 1988 (1988-11-03) abstract; figure 1	6,9
A	& US 4 827 125 A (GOLDSTEIN SETH R) 2 May 1989 (1989-05-02) cited in the application ---	
A	US 5 672 880 A (KAIN ROBERT C) 30 September 1997 (1997-09-30) abstract; figure 2 column 4, line 7 - line 21 column 5, line 40 - line 44 column 6, line 36 - line 43 -----	4-9,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/00459

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19627568 A	15-01-1998	NONE	
US 5418371 A	23-05-1995	US 5294799 A AT 152519 T DE 69402958 D DE 69402958 T EP 0681695 A WO 9418547 A JP 8506419 T	15-03-1994 15-05-1997 05-06-1997 11-12-1997 15-11-1995 18-08-1994 09-07-1996
WO 9218850 A	29-10-1992	CA 2106296 A EP 0579724 A JP 6506538 T US 5260578 A	11-10-1992 26-01-1994 21-07-1994 09-11-1993
WO 9201966 A	06-02-1992	AT 131942 T DE 69115701 D DE 69115701 T EP 0539471 A JP 5509417 T US 5304810 A	15-01-1996 01-02-1996 20-06-1996 05-05-1993 22-12-1993 19-04-1994
EP 0732582 A	18-09-1996	US 5591981 A US 5863504 A CA 2171588 A JP 9015171 A US 5784152 A US 5885531 A	07-01-1997 26-01-1999 17-09-1996 17-01-1999 21-07-1998 23-03-1999
WO 8808550 A	03-11-1988	US 4827125 A AU 1704788 A EP 0362228 A JP 2503959 T	02-05-1989 02-12-1988 11-04-1990 15-11-1990
US 5672880 A	30-09-1997	AU 3963595 A EP 0746865 A JP 9509506 T WO 9618205 A US 5719391 A	26-06-1996 11-12-1996 22-09-1997 13-06-1996 17-02-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/00459

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G02B21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G02B G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 196 27 568 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 15. Januar 1998 (1998-01-15) in der Anmeldung erwähnt Spalte 3, Zeile 8 - Zeile 23 Spalte 7, Zeile 24 - Zeile 32; Ansprüche 1,13,20-22,24,26; Abbildungen 2C,E	1-3, 18-21, 29,33, 41,44,46
X	US 5 418 371 A (ASLUND NILS R D ET AL) 23. Mai 1995 (1995-05-23) Spalte 5, Zeile 9 - Zeile 62; Abbildung 1 --- -/--	1,3,14, 18-20, 23,27, 28,30,44

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Juli 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hylla, W

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/00459

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 92 18850 A (MAYO FOUNDATION) 29. Oktober 1992 (1992-10-29) Seite 5, Zeile 30 - Zeile 34 Seite 7, Zeile 1 - Zeile 28; Abbildung 2 ----	1,3,14, 20,23, 30,33, 40,44,47
A	WO 92 01966 A (MEDICAL RES COUNCIL) 6. Februar 1992 (1992-02-06) Seite 5, Absatz 6 - Seite 7, Absatz 1; Abbildungen 1,2 ----	1-3,14, 20,23, 27,28, 30,33, 40,44,47
A	EP 0 732 582 A (BIO RAD LABORATORIES) 18. September 1996 (1996-09-18) Zusammenfassung; Abbildungen 11,20 Spalte 6, Zeile 19 - Zeile 31 Spalte 6, Zeile 56 - Spalte 7, Zeile 9 Spalte 7, Zeile 47 - Spalte 8, Zeile 19 Spalte 8, Zeile 48 - Zeile 54 ----	1-3, 17-20, 34,38, 44,45
A	WO 88 08550 A (GOLDSTEIN SETH R) 3. November 1988 (1988-11-03) Zusammenfassung; Abbildung 1	6,9
A	& US 4 827 125 A (GOLDSTEIN SETH R) 2. Mai 1989 (1989-05-02) in der Anmeldung erwähnt ----	
A	US 5 672 880 A (KAIN ROBERT C) 30. September 1997 (1997-09-30) Zusammenfassung; Abbildung 2 Spalte 4, Zeile 7 - Zeile 21 Spalte 5, Zeile 40 - Zeile 44 Spalte 6, Zeile 36 - Zeile 43 -----	4-9,11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/00459

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19627568 A	15-01-1998	KEINE	
US 5418371 A	23-05-1995	US 5294799 A	15-03-1994
		AT 152519 T	15-05-1997
		DE 69402958 D	05-06-1997
		DE 69402958 T	11-12-1997
		EP 0681695 A	15-11-1995
		WO 9418547 A	18-08-1994
		JP 8506419 T	09-07-1996
WO 9218850 A	29-10-1992	CA 2106296 A	11-10-1992
		EP 0579724 A	26-01-1994
		JP 6506538 T	21-07-1994
		US 5260578 A	09-11-1993
WO 9201966 A	06-02-1992	AT 131942 T	15-01-1996
		DE 69115701 D	01-02-1996
		DE 69115701 T	20-06-1996
		EP 0539471 A	05-05-1993
		JP 5509417 T	22-12-1993
		US 5304810 A	19-04-1994
EP 0732582 A	18-09-1996	US 5591981 A	07-01-1997
		US 5863504 A	26-01-1999
		CA 2171588 A	17-09-1996
		JP 9015171 A	17-01-1999
		US 5784152 A	21-07-1998
		US 5885531 A	23-03-1999
WO 8808550 A	03-11-1988	US 4827125 A	02-05-1989
		AU 1704788 A	02-12-1988
		EP 0362228 A	11-04-1990
		JP 2503959 T	15-11-1990
US 5672880 A	30-09-1997	AU 3963595 A	26-06-1996
		EP 0746865 A	11-12-1996
		JP 9509506 T	22-09-1997
		WO 9618205 A	13-06-1996
		US 5719391 A	17-02-1998

)

)